

表 3 含量测定样品的稳定性考察试验结果

Tab 3 The stability of anastrozole in solution

时间/h	峰面积	变化率/%	时间/h	峰面积	变化率/%
0	650 267		3	661 504	1.73
1	645 238	-0.77	4	661 287	1.69
2	647 240	-0.47			

3 批样品于 40℃, RH75% 条件下加速试验 3 个月, 结果表明, 样品含量无明显变化。见表 4。

### 11 阿那曲唑片有关物质测定

取阿那曲唑片粉末约 300 mg(约相当于阿那曲唑 3 mg)置 10 mL 量瓶中, 加流动相 8 mL, 超声 3 min, 加流动相至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为供试液。取供试液 1.0 mL 置 100 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 作为对照液, 取 20  $\mu$ L 注入液相色谱仪, 调整工作站量程, 使主成分峰能准确积分; 另取供试液 20  $\mu$ L 注入液相色谱仪依法测定, 记录色谱图至主成分峰保留时间的 2 倍, 色谱图中如有杂质峰, 量取除溶剂峰和辅料峰外各杂质峰面积总和, 用自身对照法计算杂质含量。结果表明: 阿那曲唑片加速试验 3 个月, 杂质含量较小。见表 4。

### 12 讨论

12.1 色谱系统的选择 鉴于甲醇在 215 nm 处透光率约为 50%, 而乙腈成本高、毒性大, 根据以往经验, 将甲醇和乙腈做适当配比应用, 达到合适的极性, 既降低成本, 又能满足试验要求。

12.2 对于阿那曲唑高温破坏样品, 其峰尾极易将其后的小

表 4 阿那曲唑片含量及有关物质检测结果. %

Tab 4 The contents and the related substances of anastrozole in tablets. %

批号	有关物质				含量			
	0 个月	1 个月	2 个月	3 个月	0 个月	1 个月	2 个月	3 个月
20000101	0.05	0.05	0.07	0.04	102.7	102.5	102.9	101.6
20000102	0.05	0.07	0.07	0.07	103.0	103.4	102.6	104.7
20000103	0.05	0.07	0.06	0.06	101.5	101.7	101.2	102.0

杂质峰掩盖, 流动相中加入少量的三氟乙酸做适当调整, 能将二者有效的分离。也曾试用加入约 10 mmol·L<sup>-1</sup> 的三乙胺, 但效果不理想。

12.3 本法曾在 Kromail C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm×250 mm, 5  $\mu$ m)、Spherigel C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm×200 mm, 5  $\mu$ m)和 Diamosil C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm×200 mm, 5  $\mu$ m)进行试验, 对流动相做适当调整均可得到较好的分离效果。

### 参考文献

- [1] 冯奉仪, 徐兵河, 江泽飞, 等. 瑞宁得治疗绝经后妇女晚期乳腺癌临床研究[J]. 中华肿瘤杂志, 1999, 21(5): 376.
- [2] Jurgen G, Hildegunn B, Eystein L P, A novel HPLC-RIA method for the simultaneous detection of estrone, estradiol and estrone sulphate levels in breast cancer tissue[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2000, 72(5): 259.
- [3] Bock Mary J H, Ilene B, Norman L, et al. Validated assay for quantification of anastrozole in human plasma by capillary gas chromatography-63Ni electron capture detection[J]. J Chromatogr B: Biomed Sci Appl, 1997, 700(1+2): 131.
- [4] 中国药典. 1995 年版二部[S]. 1995. 附录 IV A.

(收稿日期 2001-11-19)

## 反相高效液相色谱法测定血浆中多奈哌齐浓度

余勤, 梁茂植\*, 黄英, 秦永平, 邹远高(四川大学华西医院临床药理研究室, 四川 成都 610041)

摘要: 目的 建立反相高效液相色谱法测定人血浆中多奈哌齐浓度。方法 采用美国 Waters 公司 680 型高效液相色谱仪, 486 紫外可变波长检测器, YMC-Pack ODS(150 mm×3.9 mm, 5  $\mu$ m) 色谱柱, 柱温 62℃, 以 CH<sub>3</sub>OH-0.01 mol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> = 65:35 (pH 7.50) 为流动相, 甲泼尼龙做内标, 在 314 nm 波长处检测。结果 标准曲线线性范围 1.00~20.00  $\mu$ g·L<sup>-1</sup>, 萃取回收率 71.6%~76.0%, 加样回收率 99.8%~108.9%; 日内 RSD 为 2.7%~10.3%, 日间 RSD 为 1.8%~9.9%。结论 本方法快速、灵敏、准确、简便, 可用于多奈哌齐血药浓度测定和药动力学及生物利用度研究。

关键词: 多奈哌齐, 血药浓度, 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101

文献标识码: A

文章编号: 1001-2494(2003)02-0137-03

### Study on determination of donepezil in human plasma by means of reversed-phase HPLC

YU Qin, LIANG Mao-zhi\*, HUANG Ying, QIN Yong-ping, ZOU Yuan-gao (Department of Clinical Pharmacology, West China College of Clinical Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

ABSTRACT OBJECTIVE To develop a method for the determination of donepezil in human plasma by RP-HPLC. METHODS

作者简介: 余勤, 女, 讲师 Tel (028) 85422709 E-mail: yusunny99@yahoo.com.cn

\* 通讯作者: 梁茂植, 男, 研究员, 硕士生导师 Tel (028) 86119996 E-mail: Fish69@mail.china.com

The plasma sample was extracted with 5 mL chloroform (CHCl<sub>3</sub>), then separation was achieved on the YMC-Pack ODS (150 mm × 3.9 mm, 5 μm) column. The mobile phase was consisted of CH<sub>3</sub>OH-0.01 mol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> = 65:35 (pH 7.50) and the eluate was measured at UV 314 nm. Methylprednisolone was used as the internal standard. **RESULTS** The retention times for Donepezil and methylprednisolone were 7.89 min and 6.66 min respectively. The calibration curves were linear over the range of 1.00~20.00 μg·L<sup>-1</sup>. The limit of detection was 1.0 μg·L<sup>-1</sup>. The extraction recovery of donepezil were 71.6%~76.0%. The recoveries were 99.8%~108.9%. The inter-day RSD was 1.8%~9.9% and within-day RSD 2.7%~10.3%. **CONCLUSION** The assay was simple, rapid and sensitive. It is suitable to be used to study the pharmacokinetics and relative bioavailability of donepezil.

**KEY WORDS** donepezil; plasma concentration; HPLC

多奈哌齐 (donepezil, E2020) 系第二代治疗阿尔茨海默病的胆碱酯酶 (AChE) 抑制剂, 能够增加大脑乙酰胆碱含量, 是治疗早、中期老年性痴呆的有效药物<sup>[1-2]</sup>。作者尚未见国内有该药物的血药浓度测定报道。为考察 E2020 片剂和胶囊剂的人体相对生物利用度, 本实验建立了测定 E2020 血浆浓度高效液相色谱法。

## 1 仪器和试剂

### 1.1 仪器和色谱条件

美国 Waters 公司 680 型高效液相色谱仪, 486 紫外可变波长检测器, 510 型高压泵, 7725 型进样阀, 岛津 C-R7Ae 型色谱数据处理机。使用 YMC-Pack ODS (150 mm × 3.9 mm, 5 μm) 色谱柱, 柱温 62℃, 以 CH<sub>3</sub>OH-0.01 mol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> = 65:35 (pH 7.50) 为流动相, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 314 nm, 灵敏度 0.002 AUFS。

### 1.2 试剂

E2020 对照品 (重庆桑田药业有限公司, 纯度 99.6%, 批号 990918), 内标甲泼尼龙对照品 (四川省药品检定所)。所用甲醇、三氯甲烷为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 蒸馏水经重蒸馏再处理。

### 1.3 对照品储备液

精密称取 E2020 和甲泼尼龙对照品各 5.0 mg, 用重蒸馏水分别定容于 50 mL 量瓶中, 即得 E2020 和内标储备液 (100 mg·L<sup>-1</sup>), 置 4℃ 冰箱保存, 临用时将 E2020 和内标储备液用重蒸馏水稀释成系列工作液。

## 2 方法与结果

### 2.1 标准曲线

取正常人空白血浆 0.5 mL 共 8 份, 分别加入 E2020 标准系列工作液使各管血浆浓度分别为: 20.00, 16.00, 12.00, 8.00, 6.00, 4.00, 2.00 和 1.00 μg·L<sup>-1</sup>, 各加内标工作液 100 μL (含甲泼尼龙 0.43 μg), 再加 10% 三羟甲基氨基甲烷液 0.5 mL, 混匀后用 5 mL 三氯甲烷旋涡萃取 10 min, 离心 (3 000 r·min<sup>-1</sup>) 10 min, 抽弃上层液, 转移下层有机相于硅烷化尖底试管, 于 40℃ 水浴通气流烘干, 残渣用流动相 70 μL 溶解, 进样 50 μL。用 E2020 和内标的色谱峰高比与对应浓度回归得线性方程:  $Y = 0.0548X + 0.0089$  ( $r = 0.9991$ )。

### 2.2 样品测定

取样品血浆 0.5 mL 于试管中, 加入重蒸馏水 100 μL 代替 E2020 工作液, 其余步骤按“2.1”项操作, 记录色谱峰高,

计算峰高比, 用标准曲线计算对应的 E2020 浓度。E2020 及内标的血浆色谱图见图 1。

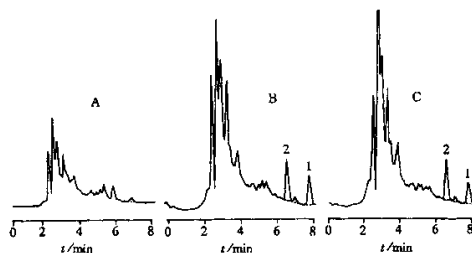


图 1 多奈哌齐血浆色谱图

A-空白人血浆色谱图; B-E2020 标准品血浆色谱图; C-E2020 样品血浆色谱图; 1-E2020 2-甲泼尼龙

Fig 1 Chromatogram of donepezil in plasma

A - blank plasma; B - plasma of standard with E2020; C - simple plasma with E2020; 1 - E2020 2 - methylprednisolone

### 2.3 保留时间及定量限

E2020 及内标的保留时间分别为 7.89 min 和 6.66 min。实验测得血浆中 E2020 最低定量浓度为 1.00 μg·L<sup>-1</sup> (以信噪比 10:1 计)。

### 2.4 萃取回收率

将一定量的 E2020 加入空白血浆中, 制成高、中、低 3 种浓度的血浆样品, 按“2.2”项处理, 同时制备相同浓度的水溶液样品, 通空气挥干后直接溶解进样, 计算其萃取回收率分别为 (76.0 ± 1.8)%, (74 ± 4)% 和 (71.6 ± 1.9)%。

### 2.5 方法回收率

将一定量的 E2020 加入空白血浆中, 制成高、中、低 4 种浓度的血浆样品, 按照样品测定法测定浓度 6 次, 计算方法回收率, 见表 1。

### 2.6 方法精密度

表 1 血浆中多奈哌齐的方法回收率,  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$

Tab 1 Recovery of the assay.  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$

加入量/μg·L <sup>-1</sup>	回收率/%	RSD/%
16.0	101.1 ± 2.7	2.70
8.0	100 ± 5	5.39
4.0	109 ± 11	10.25
1.25	104 ± 11	10.49

将一定量的 E2020 加入空白血浆中, 制成为 16.0, 8.0, 4.0 和 1.25 μg·L<sup>-1</sup> 的高、中、低 4 种浓度血浆样品, 按照样品测定法于同 1 d 内重复测定同一浓度 6 次, 并分别在不同天重复测定 6 次, 其日内和日间 RSD 见表 2。

表 2 血浆中多奈哌齐的测定方法精密度,  $n = 6$   $\bar{x} \pm s$

Tab 2 Precision of the assay.  $n = 6$   $\bar{x} \pm s$

	加入量/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	实测量/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD/%
日内	16.00	16.2 ± 0.4	2.71
	8.00	8.0 ± 0.4	5.39
	4.00	4.4 ± 0.5	10.25
	1.25	1.3 ± 0.10	8.00
日间	16.00	15.79 ± 0.28	1.79
	8.00	8.7 ± 0.3	3.86
	4.00	4.19 ± 0.28	6.74
	1.25	1.32 ± 0.13	9.85

### 3 应用

24 例健康志愿者先后分别单剂量口服重庆桑田药业有限公司研制的盐酸多奈哌齐片(试验制剂,批号 20000501)及英国 Boots 制药有限公司生产的安里申片(参比制剂,批号:81277) 5 mg 后,用本法测定了血浆中各时间点的多奈哌齐浓度。结果表明,多奈哌齐的体内过程符合二室开放模型,试验制剂和参比制剂主要药动学参数如下:AUC<sub>0-t</sub>分别为(544.48 ± 113.49)和(543.30 ± 135.12)  $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $P > 0.05$ ),90%置信区间为[92.8% ~ 107.6%];AUC<sub>0-inf</sub>分别为(656.18 ± 156.78)和(687.93 ± 155.66)  $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $P > 0.05$ ),90%置信区间为[86.0% ~ 103.4%]; $t_{\text{max}}$ 分别为(2.31 ± 0.38)和(2.31 ± 0.55) h ( $P > 0.05$ ),90%置信区间为[92.7% ~ 109.1%]; $c_{\text{max}}$ 分别为(15.36 ± 2.83)和(15.37 ± 2.38)  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $P < 0.05$ ),90%置信区间为[97.3% ~ 102.7%],与国外文献报道相似<sup>[1-4]</sup>。以安里申片为参比,试验制剂相对生物利用度为 103.21%,两种制剂具有生物等效性<sup>[5]</sup>。

### 4 讨论

国外文献报道的多奈哌齐 HPLC 测定法<sup>[1-2]</sup>,需经两次萃取后再反萃除去杂质,预处理步骤较复杂。本实验选择不同浓度的氢氧化钠液、不同 pH 值的磷酸盐缓冲液等各种碱性条件,分别选择醋酸乙酯、氯仿、二氯甲烷、正己烷、异丙醇等试剂进行萃取,结果表明应用 10% 三羟甲基氨基甲烷既可置换血浆蛋白结合的多奈哌齐,又能调节适宜的萃取 pH,经 5 mL 三氯甲烷一次萃取,即可达到满意的萃取回收率和方法回收率,降低了测定的可变性。

本研究发现普通玻璃试管对多奈哌齐有吸附作用,对低浓度药物的萃取率影响明显。经对配制多奈哌齐对照工作液的容器和提取过程中关键步骤的试管硅烷化处理后,在高、中、低浓度样品的回收率明显改善。本法操作简便、快速,具有良好的准确度及重现性,在多奈哌齐药动学及生物利用度等研究应用中获得良好结果。

### 参考文献

- [1] ihara M, Ohxishi A, Tomono Y, et al. Pharmacokinetics of E2020, a new compound for Alzheimer's disease in healthy male volunteers[J]. *Int J Clin Pharm Ther Toxicol*, 1993, 31(5): 223.
- [2] Ohnishi A, Mihara M, Kamakura H, et al. Comparison of the pharmacokinetics of E2020, a new compound for Alzheimer's disease in healthy young and elderly subjects[J]. *J Clin Pharmacol*, 1993, 33: 1086.
- [3] Rogers SL, Friedhoff LT. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of donepezil HCl following single oral doses[J]. *Br J Clin Pharmacol*, 1998, 46(1): 1.
- [4] Rogers SL, Cooper NM, Sukovaty R, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of donepezil HCl following multiple oral doses[J]. *Br J Clin Pharmacol*, 1998, 46(1): 7.
- [5] 梁茂植,徐楠,余勤,等.国产多奈哌齐胶囊人体药代动力学和相对生物利用度研究[J]. 2001, 17(5): 356.

(收稿日期 2001-08-14)

## 中国药学期刊将继续开办继续教育栏目

随着我国医药卫生事业的发展以及新的《药品管理法》和《医疗机构药事管理暂行规定》的出台,药师的职责已发生了重要变化,其全部活动转向以患者为中心,同时,医药技术的日新月异也对医院以外众多从事基础研究的药学工作者的专业知识提出了新的要求。因此,对医院药师和广大药学工作者进行继续教育成为当前重要课题。本刊从 2002 年 6 月开始与北京双鹤药业经营有限公司联合开办继续教育栏目,收到了较好的社会效益。为此,现决定 2003 年继续开办此栏目,给大家一个继续教育的平台和自学进修的园地,认真阅读和学习本刊每期刊出的文章后,回答与此相关的提问,这是继续教育的又一良好方式。

本刊每期将在继续教育栏目中刊出 10 道与本期杂志所登载文章相关的药学测试题(由医药专家组命题),参加者可通过认真阅读当期杂志回答问题,并将答案(复印有效)于当月最后一天前寄至本刊编辑部(以邮戳为准)。全部问题 70% 以上答对者将可获得全国继续医学教育二类学分。

全国医药工作者、医药大中专院校学生均可通过在本刊注册参加此继续教育项目。具体事项如下:

- 1 参加者 2003 年注册费 100 元(中国药学会会员为 80 元,以会员证复印件为准)经注册后方有资格参加答题并获得学分。
- 2 2003 年共 12 期共授予参加者二类学分 12 分,所有参加者均可根据自身情况选择参加次数(即所需学分),并在注册表上注明。本刊每期文章阅读量约为 6 小时(同时答题合格者授予 1 学分),收取学费 10 元,以后每增加一期阅读自学加收学费 10 元。以上两项费用包括专家命题、审评费以及学分证工本费。
- 3 注册费、学费请与注册表(见本刊 2003 年第 1 期 44 页)同时寄出。

通讯及汇款地址:北京东四西大街 42 号中国药学期刊编辑部,邮政编码:100710,电话:(010) 65229531 (010) 65597969; 传真:(010) 65597969,联系人:孙淑芬。

本栏目由北京双鹤药业经营有限责任公司协办。

[本刊讯]